

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE BIOCIENCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E**  
**MOLECULAR**

**Vanessa Athaide Garcia**

**Efeitos do Bloqueio do Receptor GRPR, sobre a Preferência  
pelo Odor Materno e o Condicionamento Olfativo em Filhotes  
Machos de Ratos**

**Orientadora: Dra Nadja Schröder**

**Porto Alegre**

**Janeiro de 2010**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E**  
**MOLECULAR**

**Vanessa Athaide Garcia**

**Efeitos do Bloqueio do Receptor GRPR, sobre a Preferência pelo Odor Materno e o Condicionamento Olfativo em Filhotes Machos de Ratos**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências

**Orientadora: Dra Nadja Schröder**

**Porto Alegre**

**Janeiro de 2010**

## RESUMO

O receptor do peptídeo liberador de gastrina tem sido considerado como um novo alvo molecular em desordens do desenvolvimento neurológico. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o bloqueio farmacológico do GRPR durante o período neonatal em ratos produz características comportamentais que tem sido associadas com distúrbios autistas, tais como déficits de comportamento social. Alterações no comportamento de estabelecimento de vínculos podem desempenhar um papel importante na disfunção de comportamento social apresentada por crianças autistas. Ratos filhotes machos receberam duas injeções intraperitoneais diárias do antagonista do GRPR (RC-3095) do 1º ao 10º dia de vida pós-natal. No 11º dia de vida os filhotes foram submetidos à tarefa de preferência pelo odor materno e ao completarem 15 dias, à tarefa de condicionamento aversivo ao odor. Os resultados do presente trabalho demonstram que o bloqueio do GRPR no período neonatal pela administração sistêmica do antagonista RC-3095 induz uma redução na preferência pelo odor materno, uma tarefa que envolve o comportamento de apego, em ratos lactentes. Provavelmente, este efeito prejudicial possa representar uma disfunção específica no comportamento de apego mais do que um prejuízo no aprendizado do odor, pois animais que receberam RC-3095 mostraram uma resposta normal ao condicionamento aversivo ao odor. Estes resultados fornecem a primeira evidência de que o GRPR regula o comportamento de preferência materna e são consistentes com a visão de que o GRPR está envolvido com mecanismos comportamentais associados a perturbações do desenvolvimento neurológico.

Palavras-chave: Receptor do peptídeo liberador de gastrina - RC-3095 - Preferência pelo odor materno - Condicionamento aversivo ao odor – Apego - Autismo.

## ABSTRACT

The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has been put forward as a novel molecular target in neurodevelopmental disorders. We have previously shown that pharmacological blockade of the GRPR during the neonatal period in rats produces long-lasting behavioral features associated with autistic disorders, such as deficits in social behavior. Alterations in attachment behavior might play a role in the dysfunction in social behavior displayed by autistic infants. Here we show that neonatal GRPR blockade by systemic administration of the GRPR antagonist RC-3095 induces a reduction in maternal odor preference, a task involving attachment behavior, in infant rats. This impairing effect is likely to represent a specific dysfunction of attachment behavior rather than a general impairment of odor learning, since animals given RC-3095 showed normal aversive odor conditioning. These findings provide the first evidence that the GRPR regulates maternal preference and are consistent with the view that the GRPR is involved in behavioral features associated with neurodevelopmental disorders.

Keywords: Gastrin-releasing peptide receptor. RC-3095. Maternal odor preference. Odor-shock conditioning. Attachment. Autism.

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE.....	iii
1 CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1.1 Bombesina.....	2
1.1.2 Peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor (GRPR).....	3
1.1.3 Antagonista do GRPR – RC-3095.....	5
1.1.4 Aprendizado olfativo.....	7
1.2 OBJETIVOS.....	10
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2 CAPÍTULO 2.....	11
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO submetido ao periódico <i>Peptides</i> .....	12
3 CAPÍTULO 3.....	32
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXO – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	42

## **CAPÍTULO 1**

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 BOMBESINA

A bombesina (BB) consiste em um peptídeo análogo ao Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP, sigla do inglês *Gastrin Releasing Peptide*), inicialmente isolado da pele de uma rã da espécie *Bombina bombina* (Anastasi *et al.*, 1973). A investigação da presença de sítios de ligação de BB no sistema nervoso central (SNC) demonstrou que ela liga-se com alta afinidade às membranas cerebrais de ratos (Moody *et al.*, 1978). Foi também descrito pelo mesmo grupo, que as mais altas densidades de sítios específicos de ligações encontram-se no hipocampo, uma região muito relacionada com a plasticidade sináptica, memória e desordens neuropsiquiátricas, tais como a esquizofrenia e a doença de Alzheimer. Outras áreas cerebrais apresentando altas concentrações de peptídeos da família da BB incluem o núcleo do trato solitário, amígdala e hipotálamo (Moody *et al.*, 1979; 1981).

Os efeitos comportamentais da administração de agonistas e antagonistas do Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR, sigla do inglês *Gastrin Releasing Peptide Receptor*) vêm sendo reportados em alguns estudos. Dentre eles a indução do comportamento de afagar a pele ou os pêlos de um membro da comunidade a fim de fortalecer os vínculos afetivos e manter a unidade do grupo em ratos (*grooming*), através de infusões intracerebrais de BB. O comportamento de *grooming* induzido por esta injeção é dependente do GRPR e é atenuado por antagonistas de receptores dopaminérgicos (Piggins e Merali, 1989, Merali *et al.*, 1990). Sugere-se que esse comportamento deva estar relacionado à resposta ao estresse e, que a administração de BB induza um efeito autônomo, endócrino e comportamental similar àqueles

apresentados pela exposição à estressores, sugerindo um possível papel dos GRPRs na mediação de respostas ao estresse e a ansiedade (Merali *et al.*, 1990, Moody *et al.*, 2004).

### **1.1.2 PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA (GRP) E SEU RECEPTOR (GRPR)**

Estudos anteriores descreveram que o peptídeo que está funcionalmente e estruturalmente relacionado à BB em cérebro de mamíferos corresponde ao GRP. Composto por 27 aminoácidos, ele é sintetizado como um precursor com 148 aminoácidos (PreproGRP) no núcleo neuronal e subsequentemente sofre maturação pós-traducional (Spindel *et al.*, 1984, Spindel *et al.*, 1990).

O GRP presente no SNC é um membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G, contendo sete domínios transmembrana e 348 aminoácidos. Estudos *in vitro* utilizando técnicas de autoradiografia indicaram que as áreas que contêm altas densidades de GRPRs incluem o bulbo olfatório, núcleo accumbens, caudado-putâmen, amígdala central, formação hipocampal dorsal (área CA3 e giro denteado) bem como os núcleos talâmicos paraventricular, central medial e paracentral (Wolf *et al.*, 1983; Wolf *et al.*, 1985; Zarbin *et al.*, 1985; Moody *et al.*, 2004).

Respostas intracelulares para a ativação de GRPR em linhagens de células neuroendócrinas e cancerígenas têm demonstrado envolver cascatas sinalizadoras de proteínas quinases, particularmente a proteína quinase C (PKC) e rotas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) / também denominada proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (Hellmich *et al.*, 1999).



Embora os mecanismos celulares de sinalização envolvidos na mediação dos efeitos da ativação do GRPR em neurônios ainda necessitem de uma melhor caracterização, as descobertas através de estudos utilizando outros tipos celulares indicam que as rotas de PKC e MAPK devem estar importantemente envolvidas na resposta intracelular da ativação do GRPR na membrana neuronal (Lee *et al.*, 1999).

Alguns estudos demonstraram alterações nos níveis de GRP ou na função do GRPR em pacientes com desordens psiquiátricas, neurodegenerativas e no desenvolvimento nervoso. É possível que uma redução dos níveis de GRP em pacientes psiquiátricos altere a atividade regulatória destes peptídeos em funções do SNC, contribuindo assim com as manifestações clínicas. A concentração de GRP demonstrou estar significativamente reduzida no núcleo caudado e globo pálido de pacientes com doença de Parkinson (Bissette *et al.*, 1985), assim como também está reduzida na urina (Olincy *et al.*, 1999) e no fluido cerebrospinal (FCS) (Gerner *et al.*, 1985) de pacientes com esquizofrenia. Também têm-se proposto que alterações nos níveis de GRPR no SNC humano deve estar envolvidas na anorexia, bulimia nervosa e transtornos de humor (Merali *et al.*, 1999, Frank *et al.*, 2001).

O envelhecimento cerebral e a doença de Alzheimer envolvem, além de muitas anormalidades, disfunções na sinalização celular de cálcio. A homeostase alterada do cálcio foi detectada em fibroblastos de pacientes com doença de Alzheimer (Ito *et al.*, 1994; Gibson *et al.*, 1996; 1997) bem como em modelos de animais com essa doença (Leissring *et al.*, 2000). GRPs, através da ligação a GRPRs na membrana celular, agem como ativadores da cascata sinalizadora fosfoinositol/cálcio (Ito *et al.*, 1994; Gibson *et al.*, 1996). A liberação de cálcio, induzida por BB e mediada por inositol trifosfato (IP3) demonstrou estar significativamente mais acentuada em fibroblastos de pacientes com doença de Alzheimer (Ito *et al.*, 1994).

### 1.1.3 ANTAGONISTA DO GRPR – RC3095

O antagonista seletivo de GRPR [D-Tpi6, Leu13 psi(CH<sub>2</sub>NH)-Leu14] bombesina (6-14) (RC-3095) vêm sendo utilizado como uma ferramenta na investigação dos efeitos comportamentais relacionados ao bloqueio do receptor de peptídeo liberador de gastrina em modelos de roedores (Roesler *et al.*, 2004). O RC-3095 foi desenvolvido por Schally e colaboradores como um potente fármaco antitumoral (Pinski *et al.*, 1992; Yano *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 1994; Szepeshazi *et al.*, 1997; Schwartzmann, 2004).

Diante do fato de que pacientes com esquizofrenia apresentam níveis alterados de GRP (Gerner *et al.*, 1985; Olincy *et al.*, 1999), Roesler e colaboradores (2004), investigaram os efeitos da administração sistêmica de RC-3095 no comportamento estereotipado induzidos pelo antagonista do receptor dopaminérgico, apomorfina, ou pelo antagonista do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA), dizocilpina (MK-801) (Meller *et al.*, 2004). Comportamentos estereotípicos são manifestações de desordens psiquiátricas, tais como a esquizofrenia, desordem obsessivo-compulsiva e autismo. Administrações sistêmicas de RC-3095 atenuaram significativamente a estereotipia induzida por apomorfina, dando suporte à hipótese que os GRPRs estão envolvidos em padrões comportamentais de esquizofrenia e indicando que os antagonistas de GRPRs podem ser investigados como agentes com potencial atividade antipsicótica (Meller *et al.*, 2004).

Recentemente, estudos farmacológicos investigando o papel GRP e seus receptores em memória e aprendizado avaliaram os efeitos de agonistas de GRPR no desempenho de roedores em tarefas de memória. Administrações sistêmicas de BB ou GRP facilitaram o armazenamento de memória tanto em camundongos (Flood *et al.*, 1988) quanto em ratos (Rashidy-Pour *et al.*, 1998). Além disso, administrações

sistêmicas de GRP atenuaram déficits de memória em modelos amnésicos induzidos por escopolamina e hipóxia em camundongos (Santo-Yamada *et al.*, 2001). Infusões de BB no núcleo do trato solitário favoreceram a memória e permitiram a análise do núcleo do trato solitário como uma importante área, mediando os efeitos de agonistas de GRPR na memória de ratos (Williams *et al.* 1994), enquanto que inativações farmacológicas desta região atenuaram os efeitos da administração sistêmica de BB na memória (Rashidy-Pour *et al.*, 1998).

Ao serem analisados em conjunto, esses achados indicam que a ativação de GRPR no hipocampo e na amígdala (e possivelmente em outras áreas cerebrais) está importantemente envolvida na modulação do aprendizado emocional e memória em roedores. Diante desses estudos, pode-se concluir que há um forte corpo de evidências estabelecendo o GRPR entre os vários sistemas de neuroreceptores que participam da modulação da memória. Por outro lado, estudos subseqüentes são necessários para estabelecer a exata função do GRPR na regulação da memória.

Recentemente o nosso grupo de pesquisa analisou os efeitos do bloqueio do GRPR durante o período neonatal sobre parâmetros comportamentais em ratos (Presti-Torres *et al.*, 2007). Este foi o primeiro trabalho realizado envolvendo o uso do antagonismo do GRPR ainda durante o desenvolvimento neurológico desses animais. Ratos machos que receberam diferentes doses de RC3095, entre o 1º e o 10º dia de desenvolvimento pós-natal (PN1-10), ao serem submetidos à tarefa de comportamento social, reconhecimento do objeto novo e esquiva inibitória, na fase adulta, apresentaram um pronunciado isolamento social, além de importantes déficits cognitivos relacionados à memória de longa duração. Tais evidências da relação entre o bloqueio desse receptor e as alterações comportamentais observadas corroboram a hipótese de que o GRP e o GRPR estão relacionados ao desenvolvimento neurológico.

O período neonatal é uma etapa importante na maturação do sistema nervoso. Diversas experiências no início da vida podem alterar o comportamento emocional e a função cognitiva na vida adulta.

#### **1.1.4 APRENDIZADO OLFATIVO**

A função olfativa é bem conhecida e desempenha um importante papel na sobrevivência dos animais recém nascidos, bem como em seres humanos. Lactantes humanos são capazes de detectar diferentes odores logo após o nascimento, além de reter algumas memórias destes odores. Essa informação é de extrema importância para a interação mãe-bebê. Ainda não está claro se estas atrações olfativas são determinadas geneticamente ou se as aprendemos através da experiência (So *et al.*, 2008).

A memória olfativa de longo prazo é adquirida durante o período precoce pós-natal e está associada a essas funções olfativas (Teicher e Blass, 1976). A modulação olfativa das interações mãe-filhote tem sido estudada em uma variedade de espécies incluindo ratos, camundongos, ovinos e primatas não-humanos. Enquanto a memória olfativa em ratos adultos está associada com alterações no hipocampo (Staubli *et al.*, 1986; Alvarez *et al.*, 2002), amígdala (Rosenkranz e Grace, 2002; Tronel e Sara, 2002), córtex piriforme (Roman *et al.*, 1987; Litaudon *et al.*, 1997; Zinyuk *et al.*, 2001; Saar *et al.*, 2002), córtex peri-rinal (Herzog e Otto, 1998) e córtex orbito-frontal (Ramus e Eichenbaum, 2000; Rolls, 2001) muitas dessas estruturas não estão anatomicamente maduras e não são efetivamente ativadas pelo odor durante a primeira semana pós-natal em ratos.

O condicionamento pavloviano baseado no choque é a aproximação experimental mais comum usada para investigar a base neural do medo. O fenômeno do condicionamento pavloviano do medo é altamente reproduzível, e ele claramente gera respostas mensuráveis como os comportamentos de *freezing* e o *startle*, ambos vistos no repertório de tratamentos de animais confrontando predador. A aquisição do condicionamento do medo ocorre quando um estímulo neutro inicialmente é pareado com um evento aversivo de significado biológico, o estímulo não condicionado (*US*). Depois de um ou mais pareamentos, o estímulo neutro (*CS*) pode adquirir propriedades afetivas acarretando respostas tipicamente defensivas ocorrendo na presença de *US* (LeDoux, 2000). Investigações de condicionamento do medo em roedores geralmente empregam estímulos condicionados (*CSs* auditivo ou visual pareados com choque elétrico nas patas. No entanto, estudos recentes têm usado odor como estímulo condicionado, desde reconhecimento social, reprodução, detecção de predador e a utilização do olfato para alimentação (Restrepo *et al.*, 2004).

A utilização de odores como o estímulo condicionado para a produção de medo condicionado já está bem estabelecida. Otto e colaboradores (Otto *et al.*, 1997, 2000) reportaram que ratos exibem respostas de *freezing* para um odor que tenha sido previamente pareado com um breve choque, leve e curto, nas patas. Também foi demonstrado, que pistas de odor servem com *CSs* efetivos para potencializar a resposta acústica de *startle* (Richardson *et al.*, 1999; Aschall e Davis, 2002). Em ratos filhotes, o pareamento do odor com o choque estabelece a aprendizagem olfativa (Okutani *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2000). Okutani e colaboradores (1999) relataram que filhotes que foram expostos ao odor citral associado com o choque, no dia PN11 (período pós-natal), revelaram uma resposta aversiva a este odor.

A origem e o desenvolvimento do aprendizado de aversão ao odor são associados com respostas de reforço neural na amígdala durante o condicionamento do odor com o choque (Sullivan *et al.*, 2000). O mecanismo envolvido na aprendizagem olfativa precoce pós-natal em ratos envolve a modulação e a plasticidade no bulbo olfatório (Wilson e Sullivan, 1994; Sullivan e Wilson, 2003), envolvendo tanto GABA (Ácido Gama-aminobutírico) (Okutani *et al.*, 1999, 2003), noradrenalina (Sullivan *et al.*, 1989, 1992; Yuan *et al.*, 2003) e serotonina (Yuan *et al.*, 2003).

Partindo de nossos resultados anteriores e considerando a importância da aprendizagem olfativa no período neonatal é de extrema relevância a análise dos efeitos da administração do antagonista RC-3095, sobre parâmetros comportamentais tais como a preferência pelo odor materno e o condicionamento aversivo ao odor, ainda na fase neonatal.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do bloqueio dos receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) durante o período neonatal sobre a preferência pelo odor materno e o condicionamento aversivo ao odor em filhotes machos de ratos.

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos do tratamento neonatal com RC-3095, antagonista do receptor GRPR, sobre os parâmetros comportamentais de preferência pelo odor materno em filhotes machos de ratos.
- Avaliar os efeitos do tratamento neonatal com RC-3095, antagonista do receptor GRPR, sobre o condicionamento aversivo ao odor em filhotes machos de ratos.

## **CAPÍTULO 2**

**Artigo científico submetido ao periódico *Peptides***



Peptides

Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces  
maternal odor preference in rats

**Vanessa A. Garcia**<sup>a</sup>, **Arethuzza S. Dornelles**<sup>a</sup>, **Juliana Presti-Torres**<sup>a</sup>, **Luisa A. Alcalde**<sup>a</sup>, **Gilberto Schwartzmann**<sup>b, c, d</sup>, **Rafael Roesler**<sup>c, d, e</sup>, **Aldo B. Lucion**<sup>f</sup>, **Nadja Schröder**<sup>a, d, \*</sup>

<sup>a</sup> *Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>c</sup> *Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>d</sup> *National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>e</sup> *Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>f</sup> *Laboratory of Behavioral Neuroendocrinology, Department of Physiology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* *Corresponding author: Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612.*

E-mail address: [nadja.schroder@pucrs.br](mailto:nadja.schroder@pucrs.br) (N. Schröder)

## **ABSTRACT**

The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has been put forward as a novel molecular target in neurodevelopmental disorders. We have previously shown that pharmacological blockade of the GRPR during the neonatal period in rats produces long-lasting behavioral features associated with autistic disorders, such as deficits in social behavior. Alterations in attachment behavior might play a role in the dysfunction in social behavior displayed by autistic infants. Here we show that neonatal GRPR blockade by systemic administration of the GRPR antagonist RC-3095 induces a reduction in maternal odor preference, a task involving attachment behavior, in infant rats. This impairing effect is likely to represent a specific dysfunction of attachment behavior rather than a general impairment of odor learning, since animals given RC-3095 showed normal aversive odor conditioning. These findings provide the first evidence that the GRPR regulates maternal preference and are consistent with the view that the GRPR is involved in behavioral features associated with neurodevelopmental disorders.

### ***Keywords:***

Gastrin-releasing peptide receptor

RC-3095

Maternal odor preference

Odor-shock conditioning

Attachment

Autism

## 1. Introduction

The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), a member of the G protein coupled receptor (GPCR) family that binds the bombesin-like peptide GRP in the mammalian central nervous system (CNS), has been put forward by us and others as an important molecular regulator of brain function and a novel target in neuropsychiatric disorders [2,4,7,12,15,19]. GRPRs in brain areas including the amygdala and hippocampus regulate the processing of emotional information and memory [9,12-16,19,22]. In addition, we have previously shown that pharmacological blockade of the GRPR in rats during the neonatal period produces long-lasting behavioral features associated with autistic disorders, including a pronounced deficit in social interaction [10]. Together with genetic studies in humans [3,5], these findings suggest a possible role of GRPR dysfunction in the etiology of autism, and raise the possibility that GRPR blockade in rodents might be a useful experimental strategy for the development of novel animal models of neurodevelopmental disorders [10].

Alterations in attachment behavior have been proposed as etiological factors for neuropsychiatric disorders and play a role in the dysfunction in social behavior displayed by autistic infants [1,6]. We thus questioned whether GRPR blockade during the neonatal period could affect behaviors related to attachment. In infant rats, attachment is learned during the neonatal period and relies mostly on odor cues. Pups rapidly learn to approach and prefer the maternal odor within the nest. This type of odor learning is regulated by a number of neurotransmitter systems and downstream signaling pathways in brain areas including the amygdala, which might be altered in autism [8,21]. Evaluating maternal odor preference in infant rats allows the investigation of aspects of attachment

behavior relevant for autistic disorders during CNS development. In the present study we have examined maternal odor preference in infant rats treated with a GRPR antagonist from postnatal days (PND) 1 to 10. An additional experiment examined whether neonatal GRPR antagonism affected aversive odor conditioning.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Pregnant female Wistar rats were obtained from the State Health Science Research Foundation (FEPPS-RS, Porto Alegre, Brazil). After birth each litter was adjusted within 48 h to eight rat pups, and to contain offspring of both genders in about equal proportions. Each pup was kept together with its mother in an individually ventilated cage with sawdust bedding in a room temperature of  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  and a 12/12 h light/dark cycle. At the age of 4 weeks, pups were weaned and the males were selected and raised in groups of three rats [10]. For postnatal treatments, animals were given standardized pellet food and tap water ad libitum. Weight gain was measured at PND 1-10, and 15; no significant differences between groups were observed during development (data not shown). All behavioral experiments were performed at light phase between 09:00 h and 16:30 h. The experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-

23 revised 1996). All experimental protocols were approved by the institutional animal care committee. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

## *2.2. Drugs and pharmacological procedures*

Male pups were given two daily (at 8 AM and 18 PM) intraperitoneal (i.p.) 1 ml/kg injections of saline (SAL; NaCl 0.9%;  $n = 43$ ) or the selective GRPR antagonist RC-3095 [10,13-16,22] (1 mg/kg; AEterna Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany;  $n = 37$ ) dissolved in SAL, at PND 1 to 10, as previously described [10]. Drug solutions were prepared immediately prior to administration.

## *2.3. Maternal odor preference*

On PND 11, SAL- and RC-3095 treated rat pups were submitted to the maternal odor preference test. The maternal odor preference task was performed as previously described [11]. The test consisted of a two-odor choice between areas with the nest or fresh bedding. A Plexiglas box (34 cm long X 24 cm high X 40 cm wide) divided by a 2-cm wide neutral zone running the length of the box was used. In each area, 300 ml of fresh or nest bedding was placed in adjacent corners. A pup was placed in the 2-cm neutral zone at the end of the box facing the opposite target beddings. During the 1-min trial, the amount of time the pup

(the head or the whole body) spent over each of the two areas was recorded. Animals were tested in five trials with an interval of 2 min during which the pup was taken back to the home cage. In each trial, beddings were switched between the sides of the box. Following each test period, the box was cleaned with 70% ethanol to remove trace odors. The total time in each area was obtained by the sum of the five trials.

#### *2.4. Odor-shock conditioning*

To verify whether the impairment induced by neonatal GRPR blockade is specifically related to maternal odor preference or a general impairment of odor memory, a subset of rats used in the maternal odor experiment were further subdivided into four groups and trained in odor-shock conditioning, a type of aversive odor memory in which the animals learn to associate an odor with a footshock. Odor-shock conditioning started on PND 15 and was performed for 4 consecutive days. The general procedures followed those previously described [18,20]. The pups were trained in a translucent 23,0 X 24,5 X 20,5 cm Pexiglas chamber with a stainless steel grid floor. The unconditioned stimulus (US) consisted of three 0.5 mA, 1 s footshocks, presented at 30 s intervals. The CS (odor) was citral extract presented during the conditioning trial in a 1:10 dilution in a paper placed in plate dish below the grid floor of the conditioning chamber. A control *odor-only* subset of rats received only the odor CS. On the fifth day, a 5-



min retention test trial was performed. The time spent freezing during the test trial was taken as a measure of conditioning [18].

All behavioral experiments were videotaped and behavioral parameters were scored by an experimenter blind to the animals' treatment conditions. The video recordings were analyzed with Noldus Observer software (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands).

### *2.5. Statistics*

Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons between groups were performed using either unpaired Student's *t* tests (when the experiment had only two experimental groups, i.e., maternal odor preference) or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests when appropriate. In all comparisons,  $P < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## **3. Results**

### *3.1. Maternal odor preference*

Animals treated with RC-3095 showed a reduction of about 15% in the time spent over the nest bedding area (Fig. 1). Analysis with a Student's *t* test

revealed a significant difference between animals given RC-3095 and control rats ( $P = 0.007$ ), indicating that the GRPR antagonist produced a significant reduction in maternal odor preference. There was no significant difference between groups in the total time spent in both the nest bedding and fresh bedding areas (means  $\pm$  S.E.M were  $296.1 \pm 3.8$  s and  $280.1 \pm 8.3$  s; for SAL and RC-3095 groups, respectively,  $P = 0.084$ ).

### *3.2. Odor-shock conditioning*

Rats treated with either SAL or RC-3095 reached the same levels of freezing across conditioning trials, although RC-3095-treated animals showed a higher level of freezing in the first and second conditioning trials when compared to controls (both  $P$ s  $< 0.001$ ; Fig. 2A). There was no significant difference between paired odor-shock groups in the third and fourth conditioning trials ( $P$ s = 0.97 and 0.99 for 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> trials, respectively; Fig. 2A). In the conditioning test trial, there was no significant difference between rats treated with SAL and RC-3095 submitted to paired odor-shock presentations ( $P = 0.59$ ; Fig. 2B). Both these groups showed significant higher levels of freezing compared to their respective control groups presented to odor alone (both  $P$ s  $< 0.001$ ). The results indicate that the neonatal treatment with RC-3095 did not affect odor-shock conditioning.

#### 4. Discussion

Impairments in attachment behavior assessed by maternal odor preference in rodents have been proposed to model behavioral features of autistic disorders [6]. Neurochemical mechanisms mediating and/or regulating maternal odor preference and other types of odor learning include noradrenergic and serotonergic neural transmission, opioids, stress hormones such as corticosterone, and intracellular pathways involved in synaptic plasticity including the cyclic AMP(cAMP)/protein kinase A(PKA)/cAMP response element-binding protein (CREB) [6,8,11,21]. At the brain system level, maternal odor preference involves brain areas including the olfactory bulb, locus coeruleus, and amygdala [8,21].

We have previously shown that neonatal treatment with a GRPR antagonist in rats produced a pronounced deficit in social behavior accompanied by cognitive dysfunction in adulthood [10]. These findings suggest that blocking GPRP signaling during CNS development results in long-lasting behavioral features associated with neurodevelopmental disorders. In the present study we extend those findings by showing that neonatal GRPR antagonism impairs maternal odor preference in infant rats. The impairing effect is likely to represent a specific impairment of attachment behavior and maternal preference rather than a general deficit of odor learning, since animals given the GRPR antagonist showed normal aversive odor conditioning. Although increased freezing was observed in rats treated with RC-3095 in the first two blocks of conditioning trials, which might be related to an increased shock response or accelerated

acquisition, both groups reached similar levels of freezing at the end of conditioning and showed similar levels of freezing during the test trial. In addition, we have previously shown that this neonatal treatment protocol does not induce other behavioral abnormalities, such as alterations in locomotion and anxiety, which could interfere with performance in the maternal odor preference and aversive odor conditioning tasks [10]. It is possible that the GRPR interacts with other signaling pathways such as stress hormones and the cAMP/PKA/CREB pathway in regulating maternal odor preference [15,22].

The present results extend our previous evidence that GRPR dysfunction might contribute to the development of behavioral features associated with psychiatric and neurodevelopmental disorders. In particular, the findings that neonatal GRPR blockade results in reduced attachment behavior assessed by maternal odor preference (present study) and also reduced social interaction in the adulthood [10] are consistent with the possibility that an inhibition of the GRPR system during CNS development may be implicated in the social indifference displayed by autistic infants. These animal studies are consistent with evidence from human genetic studies suggesting that, at least in some patients, genetic alterations within the GRPR gene, or mutations in other genes that could affect GRPR function, might be associated with autism [3,17]. However, another study examining two polymorphic sites in the GRPR gene did not find significant differences between patients with autism and healthy subjects [5].

In summary, the present study provides the first evidence that the GRPR might regulate maternal odor preference and possibly other behaviors associated

with attachment. Further studies should explore the relationship between GRPR signaling and attachment behavior.

## **Acknowledgements**

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the National Institute for Translational Medicine (INCT program). G.S. and R.R. are supported by CNPq, the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the Children's Cancer Institute (ICI-RS; Porto Alegre, Brazil). Authors thank Bruno Carlo Cerpa Aranda, Gustavo Vedana, Luis Henrique Hamschlager, and Dr. Maria Noêmia Martins de Lima for excellent technical assistance.

## References

- [1] Bowlby J. The making and breaking of affectional bonds. I. Aetiology and psychopathology in the light of attachment theory. An expanded version of the Fiftieth Maudsley Lecture, delivered before the Royal College of Psychiatrists, 19 November 1976. Br J Psychiatry 1977;130:201-10.
- [2] Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2008;15:58-64.
- [3] Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H, Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. Hum Mol Genet 1997;6:1241-50.
- [4] Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. Pharmacol Rev 2008;60:1-42.
- [5] Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. Brain Dev 2004;26:5-7.
- [6] Moles A, Kieffer B, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the  $\mu$ -opioid receptor gene. Science 2004; 304:1983-6.

- [7] Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*. 2004 Mar;25(3):511-20.
- [8] Moriceau S, Shionoya K, Jakubs K, Sullivan RM. Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. *J Neurosci* 2009;29:15745-55.
- [9] Mountney C, Anisman H, Merali Z. Effects of gastrin-releasing peptide agonist and antagonist administered to the basolateral nucleus of the amygdala on conditioned fear in the rat. *Psychopharmacology* 2008;200:51-8.
- [10] Presti-Torres J, de Lima MN, Scalco FS, Caldana F, Garcia VA, Guimarães MR, Schwartzmann G, Roesler R, Schröder N. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* 2007;52:724-32.
- [11] Rainecki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcellos LF, Sanvitto GL, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Cammarota M, Lucion AB. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 2009;159:31-8.
- [12] Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197-204.

- [13] Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. Eur J Pharmacol 2004;486:35-41.
- [14] Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. Eur J Neurosci 2004;19: 1041-5.
- [15] Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. Neuropharmacology 2006;51:350-7.
- [16] Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. Peptides 2003;24:1069-74.
- [17] Seidita G, Mirisola M, D'Anna RP, Gallo A, Jensen RT, Mantey SA, Gonzalez N, Falco M, Zingale M, Elia M, Cucina L, Chiavetta V, Romano V, Cali F. Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2008;147B:807-13.
- [18] Sevelinges Y, Moriceau S, Holman P, Miner C, Muzny K, Gervais R, Mouly AM, Sullivan RM. Enduring effects of infant memories: infant odor-shock conditioning attenuates amygdala activity and adult fear conditioning. Biol Psychiatry 2007;;62:1070-9.



- [19] Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 2002;111:905-18.
- [20] Sullivan RM, Landers M, Yeaman B, Wilson DA. Good memories of bad events in infancy. *Nature* 2000;407:38-9.
- [21] Sullivan RM, Wilson DA. Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem* 2003;10:1-4.
- [22] Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 2005; 26:821-5.

## Legends for figures

Fig. 1. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) blockade produces a reduction in maternal odor preference in infant rats. Male Wistar rats were given an intraperitoneal (i.p.) injection of saline (SAL,  $n = 43$ ) or the GRPR antagonist RC-03095 (1 mg/kg;  $n = 37$ ) twice daily from postnatal days (PND) 1 to 10. Maternal odor preference was tested at PND 11. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. time (s) spent over the nest bedding area and fresh bedding area; \*\*  $P < 0.01$  compared to control rats, given SAL.

Fig. 2. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) blockade does not affect odor-shock conditioning in infant rats. Male Wistar rats were given an intraperitoneal (i.p.) injection of saline (SAL) or the GRPR antagonist RC-3095 (1 mg/kg) twice daily from postnatal days (PND) 1 to 10. Odor-shock conditioning training started at PND 15. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. time (s) spent freezing. (A) conditioning trials; (B) test trial;  $n = 11-16$  animals per group; \*\*  $P < 0.01$  in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> training trials compared to control rats treated with SAL. There was no significant difference in the test trial between rats treated with SAL and RC-3095 submitted to paired odor-shock presentations ( $P = 0.59$ ).

Figure 1

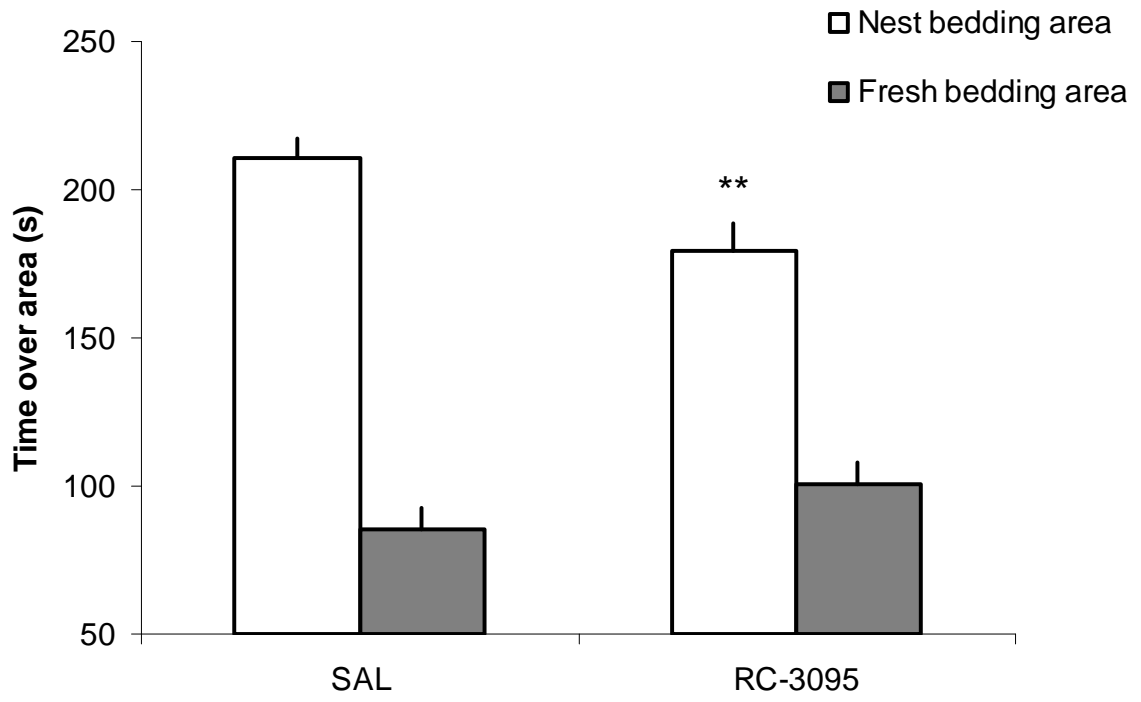
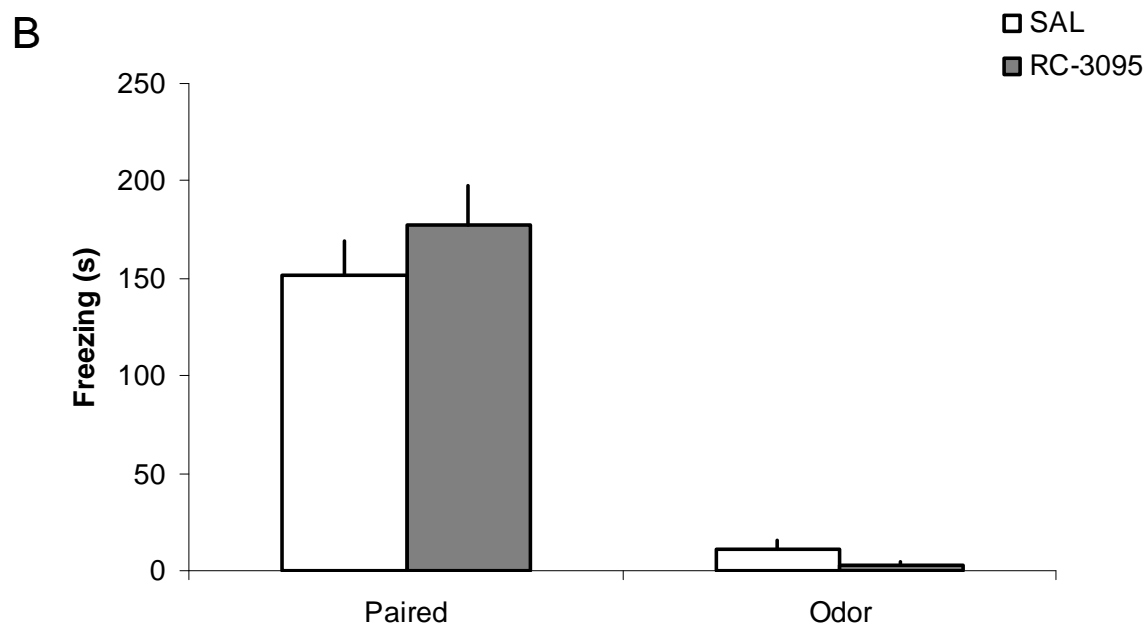
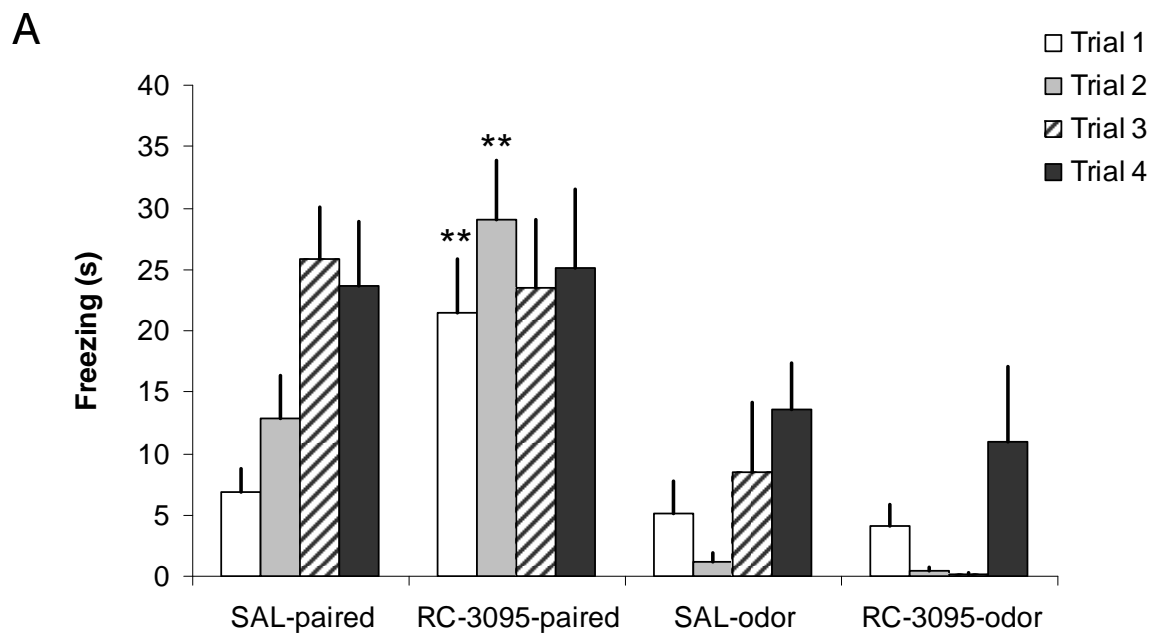


Figure 2



## **CAPÍTULO 3**

### **Considerações finais**

### 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ordem dos eventos que formam o SNC tais como a neurogênese, migração celular, especificação molecular, mielinização e sinaptogênese são altamente conservadas em todas as espécies de vertebrados incluindo os humanos. (Connors, *et al.*, 2008). Por exemplo, a maior parte dos neurônios em vertebrados é gerada durante a gestação bem como suas conexões no córtex cerebral. (Connors, *et al.*, 2008). O dramático aumento da conectividade neuronal e a reorganização das sinapses ocorrem durante o período neonatal. A formação acelerada dessas sinapses é estabelecida após o terceiro trimestre podendo gerar 40.000 sinapses por minuto persistindo até os dois anos de idade em seres humanos (Connors, *et al.*, 2008).

Algumas desordens neuropsiquiátricas como o autismo, esquizofrenia, déficit de atenção, transtorno obsessivo compulsivo e hiperatividade estão relacionadas com a arquitetura neuronal estabelecida na fase de desenvolvimento do SNC. Intervenções farmacológicas no período neonatal podem interferir na formação da conectividade neuronal e da reorganização de sinapses acarretando em algumas dessas desordens (Geschwind *et al.*, 2007).

Evidências demonstrando que o bloqueio do receptor GRPR no período neonatal acarretou um acentuado isolamento social além de déficits cognitivos relacionados à memória de longa duração na idade adulta em ratos (Presti-Torres *et al.*, 2007) reforçam a importância de estudar este tratamento em filhotes.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que os filhotes que receberam o tratamento neonatal com RC-3095 durante o 1º ao 10º dia de desenvolvimento pós-natal (PN1-10) e foram submetidos à tarefa de preferência pelo odor materno apresentaram um prejuízo de comportamento relacionado à preferência

pelo odor da mãe, sugerindo que o bloqueio do receptor GRPR reduz o vínculo entre os filhotes e a mãe. Este prejuízo é provavelmente devido a uma disfunção específica no comportamento de apego, mais do que um prejuízo no aprendizado do odor, pois, em relação à tarefa de condicionamento aversivo ao odor, observamos que tanto os filhotes que receberam o tratamento com o antagonista do GRPR quanto àqueles que receberam solução salina, apresentaram níveis similares de *freezing*. Esses resultados sugerem que o bloqueio do GRPR no período neonatal não interfere na memória de condicionamento ao odor.

A deficiência no comportamento de estabelecimento de vínculo dos filhotes com a mãe encontrada no presente trabalho pode estar relacionada com resultados publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa indicando que o tratamento com RC-3095 no período neonatal resulta em prejuízos significativos na tarefa de interação social (Presti-Torres *et al.*, 2007). É provável que a dificuldade de estabelecimento de vínculos com a mãe no período neonatal seja refletida na dificuldade de interação social apresentada posteriormente na idade adulta.

Os mecanismos neuroquímicos que medeiam e regulam o aprendizado de preferência pelo odor materno e outros tipos de aprendizado de odor incluem a transmissão neural noradrenérgica e serotonérgica incluindo opióides e hormônios do estresse como a corticosterona (Sullivan *et al.*, 2003). Envolve também vias intracelulares conhecidamente associadas à plasticidade sináptica, incluindo a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e o elemento de ligação em resposta ao AMPc (CREB) (Rainecki *et al.*, 2009). É possível que ocorra interações do GRPR com outras vias de sinalização como hormônios do estresse e com as vias cAMP/PKA/CREB na regulação do aprendizado de preferência pelo odor materno .

Em resumo, o presente estudo fornece a primeira evidência de que o GRPR pode regular a preferência pelo odor materno e possivelmente com outros comportamentos associados ao apego.



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, P.; WENDELKEN, L.; EICHENBAUM, H. Hippocampal formation lesions impair performance in an odor association task independently of spatial context. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 2, p. 470–476, 2002.

BISSETTE, G.; NEMEROFF, CB.; DECKER MW. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 17, n. 4, p. 324, 1985.

CONNORS, SL.; LEVITT, P.; MATTHEWS, SG.; SLOTKIN, TA.; JOHNSTON, MV.; KINNEY, HC.; JOHNSON, WG.; DAILEY, RM.; ZIMMERMAN, AW..Fetal Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders. **Pediatric Neurology**, v. 38, n. 3, p. 163-76, 2008.

FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. **Brain Research**, v. 460, n. 2, p. 314-22, 1988.

FRANK, G.; KAYE, WH.; LADENHEIM, EE.; MCCONAHA C. Reduced gastrin releasing peptide in cerebrospinal fluid after recovery from bulimia nervosa. **Appetite**, v. 37, n. 1, p. 9-14, 2001.

GERNER, R. H.; KAMMEN, D. P.; NINAN, PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 73-82, 1985.

GESCHWIND, D. H.; LEVITT, P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 17, n. 1, p. 103-11, 2007.

GIBSON, G.; VESTLING, M.; ZHANG, H.; SZOLOS, S.; ALKON, D.; LANNFELT, L.; GANDY, S.; COWBURN, RF. Abnormalities in Alzheimer's disease fibroblasts bearing the APP670/671 mutation. **Neurobiology of Aging**, v. 18, n. 6, p. 573-80, 1997.

GIBSON, G.; ZHANG, H.; TORAL-BARZA, L.; SZOLOS, S.; TOFEL-GREHL, B. Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1316, n. 2, p. 71-7, 1996.

HELLMICH, M. R. *et al.* Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23901-9, 1999.

HERZOG, C.; OTTO, T. Contributions of anterior perirhinal cortex to olfactory and contextual fear conditioning. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p. 1855–9, 1998.

ITO, E.; OKA, K.; ETCHEBERRIGARAY, R.; NELSON, TJ.; MCPHIE, DL.; TOFEL-GREHL, B.; GIBSON, GE.; ALKON, DL. Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 2, p. 534-8, 1994.

LEE, K.; DIXON, AK.; GONZALEZ, I.; STEVENS, EB.; MCNULTY, S.; OLES, R.; RICHARDSON, PJ.; PINNOCK, RD.; SINGH, L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons

through interaction with subtype 2 bombesin receptors. **The Journal of Physiology**, v. 518, p. 791-802, 1999.

LEISSRING, M. A.; AKBARI, Y.; FANGER, CM.; CAHALAN, MD.; MATTSON, MP.; LAFERLA, FM. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 793-8, 2000.

LITAUDON, P.; MOULY, AM.; SULLIVAN, R.; GERVAIS, R.; CATTARELLI, M. Learning induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. **The European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1593-602, 1997.

MELLER, C.; HENRIQUES, JA.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. **Peptides**, v. 25, p. 585, 2004.

MERALI, Z.; MCINTOSH, J.; ANISMAN, H. Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. **Neuropeptides**, v. 33, n. 5, p. 376-86, 1999.

MERALI, Z.; PIGGINS, H. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists on bombesin-induced behaviors. **European Journal of Pharmacology**, v. 191, n. 3, p. 281-93, 1990.

MOODY, T. W.; MERALI, Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 511-20, 2004.

MOODY, T. W.; O'DONOHUE, T. L.; JACOBOWITZ, D. M. Biochemical localization and characterization of bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. **Peptides**, v. 2, n. 1, p. 75-9, 1981.

MOODY, T. W.; PERT, C. B. Bombesin-like peptides in rat brain: quantitation and biochemical characterization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 90, n. 1, p. 7-14, 1979.

MOODY, T. W.; PERT, CB.; RIVIER, J.; BROWN, MR. Bombesin: specific binding to rat brain membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 11, p. 5372-3, 1978.

OLINCY, A. *et al.* Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 52-9, 1999.

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 110, p. 119-28, 2000.

OTTO, T.; COUSENS, G.; RAJEWSKI, K. Odor-guided fear conditioning in rats: acquisition, retention, and latent inhibition. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 6, p. 1257-64, 1997.

OKUTANI, F. Modulation of olfactory learning in young rats through intrabulbar GABA(B) receptors. **The European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 2031–36, 2003.

OKUTANI, F.; YAGI, F.; KABA, H. Gabaergic control of olfactory learning in young rats. **Neuroscience**, v. 93, n. 4, p. 1297–300, 1999.

PRESTI-TORRES, J.; DE LIMA, MN.; SCALCO, FS.; CALDANA, F.; GARCIA, VA.; GUIMARÃES, MR.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 724-32, 2007.

PIGGINS, H.; MERALI, Z. The effects of concurrent D-1 and D-2 dopamine receptor blockade with SCH 23390 and eticlopride, on bombesin-induced behaviours. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 13, p. 583-94, 1989.

PINSKI, J.; YANO, T.; REKASI, Z.; CAI, RZ.; RADULOVIC, S.; SCHALLY, AV. High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. **Regulatory Peptides**, v. 41, n. 3, p. 185-93, 1992.

QIN, Y.; ERTL, T.; CAI, RZ.; HALMOS, G.; SCHALLY, AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. **Cancer Research**, v. 54, n. 4, p. 1035-41, 1994.

RAMUS, S. J.; EICHENBAUM, H. Neural correlates of olfactory recognition memory in the rat orbitofrontal cortex. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 8199–208, 2000.

RAINEKI C, DE SOUZA MA, SZAWKA RE, LUTZ ML, DE VASCONCELLOS LF, SANVITTO GL, IZQUIERDO I, BEVILAQUA LR, CAMMAROTA M, LUCION AB. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 159, p. 31-8, 2009.

RASHIDY-POUR, A.; RAZVANI, M. E. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. **Brain Research**, v. 814, p. 127-32, 1998.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, AM.; SCHAEFER, ML.; LIN, W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 3, p. 247–56, 2004.

RICHARDSON, R.; VISHNEY, A.; LEE, J. Conditioned odor potentiation of startle in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 4, p. 787–94, 1999.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A.; SCHWARTSMANN, G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 241-2, 2004.

ROLLS, E. T. The rules of formation of the olfactory representations found in the orbitofrontal cortex olfactory areas in primates. **Chemical Senses**, v. 26, n. 5, p. 595–604, 2001.

ROMAN, F.; STAUBLI, U.; LYNCH, G. Evidence for synaptic potentiation in cortical network during learning. **Brain Research**, v. 418, n. 2, p. 221–6, 1987.

ROSENKRANZ, J. A.; GRACE, A. A. Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during Pavlovian conditioning. **Nature**, v. 417, n. 6886, p. 282-7, 2000.

SAAR, D.; GROSSMAN, Y.; BARKAI, E. Learning-induced enhancement of postsynaptic potentials in pyramidal neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, n. 5, p. 2358-63, 2002.

SANTO-YAMADA, Y.; YAMADA, K.; WADA, K. Posttraining administration of gastrin-releasing peptide improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. **Physiology & Behavior**, v. 74, p. 139-43, 2001.

SO, K.; MORIYA, T.; NISHITANI, S.; TAKAHASHI, H.; SHINOHARA, K. The olfactory conditioning in the early postnatal period stimulated neural stem/progenitor cells in the subventricular zone and increased neurogenesis in the olfactory bulb of rats. **Neuroscience**, v. 151, n. 1, p. 120–8, 2008.

SPINDEL, E. R.; GILADI, E.; BREHM, P.; GOODMAN, RH.; SEGERSON, TP. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin releasing peptide receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 12, p. 1956-63, 1990.

SPINDEL, E. R.; CHIN, WW.; PRICE, J.; REES, LH.; BESSER, GM.; HABENER, JF. Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 18, p. 5699-703, 1984.

STAUBLI, U.; FRASER, D.; KESSLER, M.; LYNCH, G. Studies on retrograde and anterograde amnesia of olfactory memory after denervation of the hippocampus by entorhinal cortex lesions. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 3, p. 432–44, 1986.

SULLIVAN, R. M.; WILSON, D. A. Molecular biology of early olfactory memory. **Learning & Memory**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2003.

SULLIVAN, R. M.; LANDERS, M.; YEAMAN, B.; WILSON, DA. Good memories of bad events in infancy. **Nature**, v. 407, n. 6800 p. 38–9, 2000.

SULLIVAN, R. M.; ZYZAK, DR.; SKIERKOWSKI, P.; WILSON, DA. The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. **Developmental Brain Research**, v. 70, n. 2, p. 279–82, 1992.

SULLIVAN, R. M.; WILSON, D. A.; LEON, M. Norepinephrine and learning induced plasticity in infant rat olfactory system. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 3998–4006, 1989.

SULLIVAN, R. M.; HOFER, M. A.; BRAKE, S. C. Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. **Developmental Psychobiology**, v. 19, p. 615–623, 1986.

SZEPESHAZI, K.; SCHALLY, AV.; HALMOS, G.; LAMHARZI, N.; GROOT, K.; HORVATH, JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor *receptors* in MXT mouse mammary cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10913-8, 1997.

TEICHER M. H., BLASS, E. M. Suckling in newborn rats: eliminated by nipple lavage, reinstated by pup saliva. **Science**, v. 193, n. 4251 p. 422-5, 1976.

TRONEL, S.; SARA, S. J. Mapping of olfactory memory circuits: Region-specific c-fos activation after odor reward associative learning or after its retrieval. **Learning & Memory**, n. 9, p. 105–111, 2002.

ZARBIN, M. A. Autoradiography localization of (125-I-Tyr4) bombesin binding sites in the rat brain. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, n. 5, p. 429, 1985.

ZINYUK, L. E.; DATICHE, F.; CATTARELLI, M. Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 124, n. 1, p. 29–32, 2001.

WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 654, n. 2, p. 251-6, 1994.

WILSON, D. A.; SULLIVAN, R. M. Neurobiology of associative learning in the neonate: early olfactory learning. **Behavioral and Neural Biology**, v. 61, n. 1, p. 1-18, 1994.

WOLF, S. S.; MOODY, TW.; O'DONOHUE, TL.; ZARBIN, MA.; KUCHAR, MJ. Autoradiographic visualization of rat brain binding sites for bombesin-like peptides. **European Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 163-4, 1983.

WOLF, S. S.; MOODY, T. W. Receptors for GRP/bombesin-like peptides in the rat forebrain. **Peptides**, v.1, p. 111-4, 1985.

YANO, T.; PINSKI, J.; GROOT, K.; SCHALLY, AV. Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 52, n. 16, p. 4545-7, 1992.

YUAN, Q.; HARLEY, C. W.; MCLEAN, J. H. Mitral cell beta1 and 5-HT2A receptor colocalization and cAMP coregulation: a new model of norepinephrine-induced learning in the olfactory bulb. **Learning & Memory**, v. 10, n. 1, p. 5–15, 2003.

## **ANEXO**

**Comprovante de submissão do artigo científico**

De: ees.peptides.0.65f98.c23945cb@eesmail.elsevier.com em nome de Peptides Editorial Office

Enviada: qui 14/1/2010 13:03

Para: Nadja Schroder

Assunto: Submission Confirmation

Dear Nadja Schröder,

Your submission entitled "Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats" has been received by Peptides

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/peptides/>.

Your username is: nadjaschroder

Your password is: xxxxxxxxxxxx

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Peptides